

2) 動物実験

畜産草地研究所 水町 功子

はじめに

実験動物は、医学、薬学、農学などの生命科学研究において有用な知見を与え、これら研究の発展に大きく貢献してきたことは疑う余地はない。その意義はこれからも変わらないと思われる。しかし、近年、動物福祉への社会の関心が高まり、平成 17 年 6 月に「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、動物実験に関する 3R、すなわち、Refinement (動物の苦痛を最小限に)、Reduction (動物使用数の削減)、Replacement (代替法の利用)の原則も盛り込まれた。したがって、実験動物を扱うにあたっては、正しい知識を身につけ、科学的かつ倫理的に適正な動物実験を行う環境を整え、実施することが重要となっている。

そこで本稿では、動物実験を計画し、実施するに際し、必要な基本的な知識、技術について解説する。実験動物には、マウス、ラット、ウサギなどの小動物のほか、ブタ、ヤギ、ヒツジ、サルなど中・大動物など多くの種類があるが、ここでは主としてマウス、ラット等の小動物を用いた動物実験について記載する。

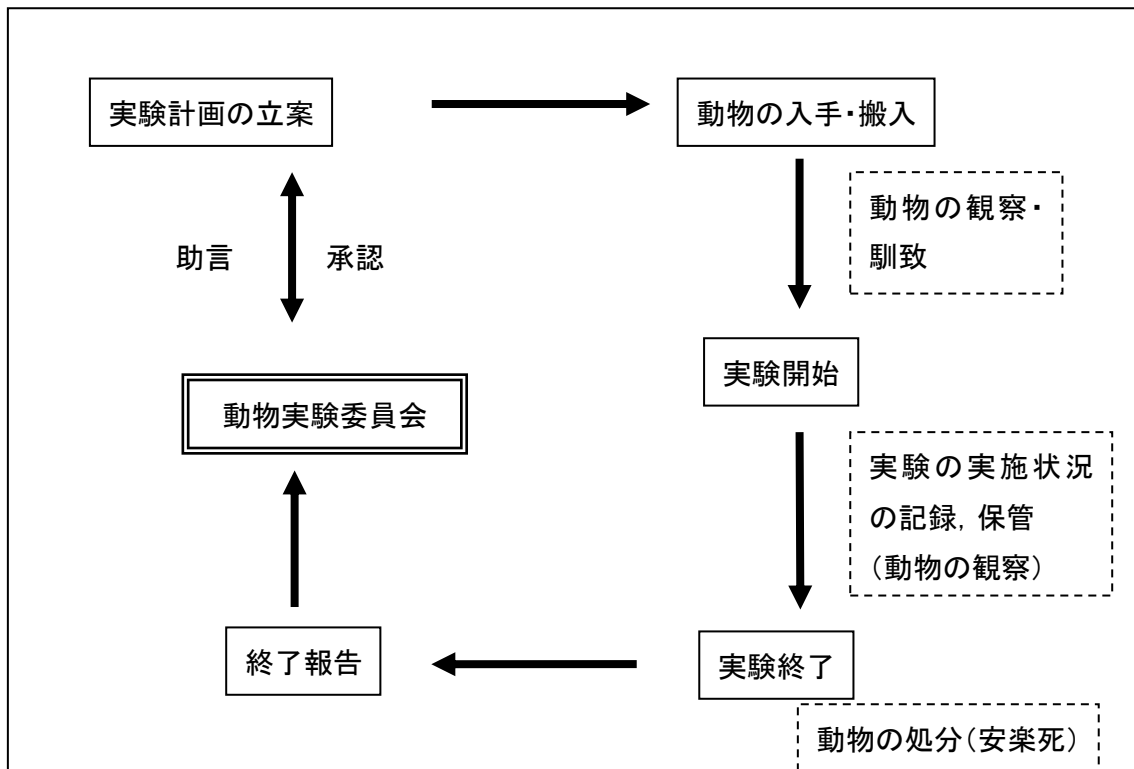


図 1 動物実験の大まかな流れ

実験を始める前に

実験を始める前に、実験者は動物実験を行うに際しての法令、規則、基本指針について知識を深め、動物の取り扱い方をはじめとする動物実験手技を学ぶ必要がある。

1. 動物実験等の実施に関する基本指針

前述の 3R の原則を盛り込んだ「動物の愛護及び管理に関する法律」に関連して農林水産省では「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、環境省は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、文部科学省は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、厚生労働省は「厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針」、日本学術会議でも「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」というように、それぞれの研究機関等において、科学的な観点から動物実験等の適正な実施を図るための基本指針を定めている。これらの指針には、動物実験委員会の設置、動物実験計画、動物実験施設および設備などに関することが示されている。これらの指針は産業動物の飼養管理の教育や畜産における育種改良を目的する試験研究については適用されないが、必要に応じて準用することが望ましいとされている。

なお、トランスジェニック動物の扱いについては、上記の関係法規、指針の他、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(通称カルタヘナ法) のルールにも従う。

2. 動物実験委員会

研究機関等においては動物実験委員会を設置し、動物実験責任者が申請した動物実験計画が、関係する法令や基本指針に従って科学的にかつ倫理的に設計されているか否かを審査し、必要に応じて助言を与え、適正に実施しているか監視を行う。

3. 動物実験の計画

動物実験計画を立てる場合には、実験動物を用いる必要があるのか(代替法はないのか)、適正な動物種や系統を選択しているか、動物福祉の観点から動物に無用な苦痛を与えないように工夫されているか、使用動物数は必要最小限か、適切な飼育環境が確保されているか、実験の安全性が確保されているかなど適切な実験が行えるように考慮する。

実験者は動物実験に先立ち、動物実験計画書を動物実験委員会等に提出し審査、承認を受けなければならない。また、必要に応じて助言を受ける。

4. その他実験に際しての諸注意

- 1) 実験者は実験手技と実験動物の取り扱いについて訓練を受け習熟していること。
特に、初めて実験動物を扱う人は経験者等の指導の元で実験を行う。
- 2) 実験の実施状況を記録し、保管する。
- 3) 動物に苦痛を与えないように最大限の努力を払う。
- 4) 実験に用いた器具等については、汚染等を起こさないように片づける。

動物の入手方法と管理

マウス、ラット、ウサギなどの実験動物の多くは実験動物生産業者を通じて入手可能である。業者以外から搬入する場合も、正規の手続きを経て合法的に行う必要がある。動物を新たに導入する場合には、特に病気の予防に注意し、健康な動物への感染や実験動物を扱うヒトへの感染、及び動物間の感染を防止する対策を講じなければならない。扱う実験動物においてどのような病気があるかを事前に調べておいた方がよい。特に SPF (Specific Pathogen Free : とくに指定された病原微生物や寄生虫がいない) 動物ではない場合、注意を要する。人獣共通感染症*が疑われる場合には、検疫なども必要となる。

1. 感染症の予防

感染症は、多くの健康な動物への被害、動物の死亡による実験不成立、実験データの異常をもたらすだけでなく、ヒトへの感染(人獣共通感染症*)の恐れもあるので、十分に注意する。

例) マウス、ラットではセンダイウイルス、マイコプラズマなど病原性の高いウイルスによる肺炎や、緑膿菌や黄色ブドウ球菌など通常は病原性を示さないが、免疫機能の低下などにより病原性を発揮する日和見感染などがある。

* 人獣共通感染症 (Zoonosis)

ヒトと動物の両方に感染または寄生する病原体による感染症で、細菌によるもの(サルモネラ症、レプトスピラ病、ブルセラ病、結核、細菌性赤痢など)、ウイルスによるもの(ラッサ熱、腎症候性出血熱、エボラ出血熱など)、原虫によるもの(トキソプラズマ病、アメーバ赤痢)、寄生虫によるもの(条虫症、旋毛虫病、回虫病など)などがある。

実験動物を微生物制御の観点で区別すると、コンベンショナル動物、SPF 動物、ノトバイオート、無菌動物に分けられる(表 1)。実験の内容等によってこれらを適宜選択する必要がある。

表 1 実験動物の分類

| 名称 | 定義 | 飼育施設 |
|------------|--|---------|
| コンベンショナル動物 | 持っている微生物・寄生虫のすべてが明確に知らされていない動物 | 一般環境 |
| SPF 動物 | とくに指定された微生物・寄生虫のいない動物 (指定以外の微生物・寄生虫は必ずしもフリーではない) | バリアシステム |
| ノトバイオート | 持っている微生物叢 (動物・植物) のすべてが明確に知らされている, 特殊に飼育された動物 | アイソレーター |
| 無菌動物 | 封鎖方式・無菌処置を用いて得られた, 検出し得るすべての微生物・寄生虫を持たない動物 | アイソレーター |

2. 飼育施設

- 1) 感染防御, ヒトへの感染防止のためにも動物の飼育は, 原則としてその動物の飼育環境が整った専用施設で飼育する. 特に, 衛生環境, 逃亡・盗難防止, 騒音・臭気を防止できるように対策を講じる.
- 2) 動物を飼育する場所は, その動物に適切なスペースを確保し, 衛生環境を整える. マウス等の小動物であれば, 空調設備, 温湿度コントロールできるところで飼育する. 栄養学的に適切な飼料 (実験動物専用の各種飼料が市販されている), 水が十分で, 動物の不安やストレス軽減対策を講じる.
- 3) 実験動物の状態をよく観察し, 健康状態を把握しておく必要がある. 病気を発見した場合は, 直ちに獣医師等の専門的知識を有する者に助言を得, 感染拡大の防止等の対策を講じる.

また, 実験者側も動物の毛や糞によるアレルギーの防止, マスク, 手袋等を着用し, ひっかき傷や咬傷の防止に努める.

3. 実験動物の情報入手先, 供給会社等 (主なもの)

The Jackson Laboratories (<http://www.jax.org/>)

Charles River Laboratories (<http://www.criver.com/>)

日本チャールス・リバー (<http://www.crj.co.jp/>)

日本クレア (<http://www.clea-japan.com/>)

日本エスエルシー (<http://www.jslc.co.jp/>)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・哺乳動物遺伝研究室

(http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/strain/index_j.php)

医薬基盤研究所・実験動物研究資源バンク (<http://animal.nibio.go.jp/>)

理化学研究所・バイオリソースセンター・実験動物開発室

(<http://www.brc.riken.jp/lab/animal/>)

一般的な実験手技（マウスを中心に）

1. 保定

実験動物に注射等の処置を行う場合、無用な苦痛を与えないように、また実験者が怪我をしないように、動物をしっかり固定する必要がある。これを保定という。実験動物によって、また処置の種類によって保定の仕方は異なる。マウスに腹腔注射や経口投与を行う場合には、利き手で尾を持ち、ケージの金網に捕まらせ（写真 1）、反対の手でマウスの首から背中にかけての皮膚を十分につかみ固定する（写真 2, 3）。また、尾を用いた注射や採血では、尾だけを露出できる保定器具を用いる。市販もされているが、適当な大きさのビーカーをかぶせるだけでもよい（写真 4）。

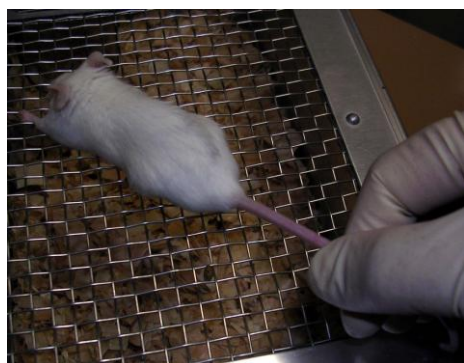


写真 1



写真 2



写真 3



写真 4

2. 麻酔

実験操作を容易にする（動物が動かないようにする）ためと、動物に無用な苦痛を与えないために適宜麻酔を用いる。その際、実験動物の種類、実験内容によってどの麻酔薬が適当か、どのくらい投与すればよいかなどを調べておく必要がある。また、麻酔薬のほとんどは、「麻薬及び向精神薬取締法」に基づく「厳重な保管・取り扱い」を行う必要があるため、使用に際しては注意する。

注) 動物実験でこれまで広く利用されてきたケタミンが麻薬指定され、使用に際し

ては「麻薬研究者免許」を取得する必要がある。麻酔には、中枢神経の活動を抑える全身麻酔と末梢神経の活動を抑える局所麻酔がある。マウス等の小動物実験では全身麻酔がよく用いられる。全身麻酔は揮発性ガスによる吸入麻酔と静脈、筋肉、腹腔注射などの注射麻酔に分けられる。以下に、よく用いられるエーテルとペントバルビタールについて説明する。

1) ジエチルエーテル (エーテル)

揮発性、引火性、爆発性の液体である。エーテルを染みこませた脱脂綿等を容器に入れ、マウスやラットを入れてふたをし、吸入麻酔とする(写真 5)。ピンセット等で皮膚を強めに挟んでも動かない状態を確認してから、実験に用いる。深い麻酔により死亡することもあるので注意する。麻酔の維持にはエーテルを染みこませた脱脂綿を鼻のあたりにかぶせることで行う。実験者が吸い込まないように、また他の動物等に影響がないように十分に注意する必要がある。火気厳禁であるのは言うまでもない。



写真 5

2) ペントバルビタール (商品名ネンブタール)

向精神薬である。動物種によって投与量、投与経路は異なる。マウス、ラット、モルモットなどは 30~40mg/kg を目安として腹腔注射する。ウサギ、ブタ、ヤギなどは 30~45mg/kg を目安に静脈注射する。通常は、5~10 分くらいで麻酔が導入され、30~60 分間持続する。麻酔のかかり具合は個体によって異なるので、特に静脈注射では半量を急速に注入した後、残り半量は様子を見ながらゆっくり投与するとよい。場合によっては追加投与を行う。

3. 薬物投与

薬物投与の方法は注射投与と経口投与に大きく分けられる。注射の経路としては、腹腔、静脈、皮下、皮内、筋肉などがある。投与量、投与物質の性質(粘度、吸収速度など)、動物種を考慮して、注射経路を選択する¹²⁾。

1) 皮下投与

動物は皮下に余裕があるので利用しやすい。皮下脂肪の少ない部位の皮膚をつまみ、注射針をさし、針先が動くことを確認してゆっくり注入する。針先を抜いた後はしっかり抑えて漏れを防ぐ。

2) 腹腔内投与 (写真 6)

後述する静脈投与より簡便であり、マウス等の小動物でよく用いられる。しかし、一度腹腔投与すると腹腔内で炎症を起こし、2 回目以降の投与時に腸管等を傷つ

ける可能性が高いので注意が必要である。

3) 筋肉内投与

痛みを伴うことがあり、投与部位は炎症を起こす場合があるので、次に投与する場合は場所を変える必要がある。主に中動物以上で用いられる。



写真 6 腹腔内投与

4) 静脈投与

マウス、ラットでは尾静脈，ウサギでは耳静脈を用いる。不溶性の物質は投与しない方がよい。静脈注射は熟練を必要とし、一度失敗すると、血管が見えなくなり困難となる。

5) 皮内投与

マウスにおける皮内投与部位は、足せき（足の裏）、耳介などである。免疫、炎症、感作反応の評価によく用いられる。皮膚の厚みに応じて、0.05～0.1 ml の投与容量を投与することができる。

6) 経口投与

吸収への影響を考慮して、食事制限や投与時間帯などの検討が必要な場合もある。投与量は適正な範囲とし、多すぎると腸管への到達時間や吸収量に影響する場合もあるので注意する。マウスやラットでは専用のニードル（経口ゾンデ）が市販されている（写真 7）。頭をそらせて、口、咽頭、食道、胃が一直線になるようにしっかりと保定し、ゾンデを食道から胃に挿入する（写真 8）。投与量はマウス・ラットで 10ml/kg 程度である。このときスムーズに挿入できていればほとんど抵抗はない。もし抵抗があった場合は周囲の組織を傷つけるので無理はしない。慣れればほとんど時間はかからない。



写真 7 経口ゾンデ

左：マウス用，右：ラット用

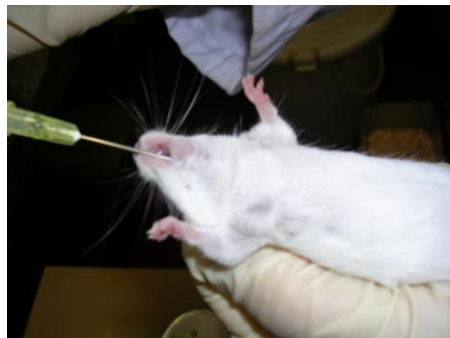


写真 8 ゾンデを用いた経口投与

4. 採血

マウス、ラットなどの小動物からの経時的な採血方法としては、尾静（動）脈，眼窩静脈叢からの採血方法が主に行われている。採血量は実験に必要な最小量とする。

反復採血においては、採血量によっては血液成分が採血前の状態に回復するのにかなりの時間を必要とするので、採血間隔にも留意する必要がある。循環血液量の 15%以上採血すると回復に 4 週間かかるともいわれる。尾静（動）脈採血では、マウスやラットを保温し、血管拡張させると採血しやすい。尾の両側（静脈）、下部（動脈）を軽くメスで傷つけ付け、血液を採取する。採血量はマウスで 0.1～0.3 ml、ラットでは 0.3～1.0 ml 程度である。採血後はその部位を圧迫することで止血する。眼窩静脈叢からの採血では、軽麻酔下で採血用毛細管（ヘマトクリット測定用微小管）を眼球と下眼瞼の間に差し込み、毛細管現象により血液を得る。マウスでも 0.1 ml くらいは採血できる。

また、採血に際しては、ヘパリンなどの抗凝固剤などを必要とするかどうか検討する必要がある。

5. 安楽死

動物実験においては、実験の目的上の理由のほか、試験中止や終了した場合、動物に苦痛を与えないように安楽死をさせる。実験動物の安楽死の方法について、「動物の処分方法に関する指針（平成 7 年 7 月 4 日総理府告示第 40 号 一部改正 平成 12 年 12 月 1 日、平成 19 年 11 月 12 日）」「実験動物の飼育及び保管等に関する基準（昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号一部改正 平成 14 年 5 月 28 日）」に従う。

- 1) 麻酔の多量投与による安楽死：通常の麻酔量の 2～4 倍くらいのペントバルビタール（ネンブタール）などを急速に投与することで安楽死できる。
- 2) エーテルによると殺は、密閉できる容器にエーテルを染みこませた脱脂綿等をおき、密閉する。最初は麻酔状態となり、通常は 5 分ほどで死に至るが、絶命したことを確認してから処理する。
- 3) 炭酸ガス窒息法では、密閉できる容器やビニール袋等に直接マウス等を入れ、炭酸ガスを充満させ、密閉して窒息させる。速やかに死に至る。炭酸ガスは CO₂ インキュベーター用のボンベから、またはドライアイスでもよい。エーテルのように引火性、揮発性がなく、また血中にエーテルが混入することもない。
- 4) 頸椎脱臼では、頸椎を指やピンセットなどを用いて、頸部と頭部を一気に伸ばして脱臼させる。

その他の注意事項

- ・動物に不安感を与えないように、適切に保定する。
- ・動物にできるだけ苦痛を与えないように、処置開始から意識消失までの時間をできるだけ短くすることが望ましい。筋弛緩剤の使用は、投与した動物は眠るように倒れるが、実は意識は消失していないので不適である。安楽死はあくまで動物側に立

って実施されるべきである。

- ・人の安全の面からみて、引火性の強いエーテル、肝、腎、心などに毒性の強いクロロホルムなどは好ましくない。
- ・処置後、実験動物が確実に死亡していることを確認する。

参考文献

- 1) 動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律について(平成年 6 月 22 日公布, 平成 18 年 6 月 1 日施行, 環境省)
- 2) 実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年 4 月 28 日 環境省告示第 88 号)
- 3) 農林水産省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日 農林水産省)
- 4) 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日 文部科学省告示第 71 号)
- 5) 厚生労働省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日 厚生労働省)
- 6) 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 18 年 6 月 1 日 日本学術会議)
- 7) 実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和 55 年 3 月 27 日 総理府告示 第 6 号)
- 8) 産業動物の飼養及び保管に関する基準(昭和 62 年総理府告示第 22 号)
- 9) 動物の処分方法に関する指針(平成 7 年 7 月 4 日総理府告示台 40 号)
- 10) 日本生化学会編, 新生化学実験講座 19「動物実験法」(東京化学同人, 東京)(1991)
- 11) 野村慎太郎, 「マウス解剖イラストレイテッド」 細胞工学別冊(秀潤社, 東京)(2002).
- 12) Leenaars M. and Hendriksen CF., Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J.*, **46**, 269-279 (2005).

3. 実験動物による機能性評価

1) 免疫調節機能評価

畜産草地研究所 水町 功子

はじめに

生体には、病原菌などの外来物質に対して B 細胞や T 細胞などのリンパ球系細胞が反応して、外来物質を排除する獲得免疫機構が備わっている。そして、この免疫機構は年齢や生理状態などによって影響を受けることが知られている。実験的には、ある抗原を実験動物に投与（免疫）することにより、その抗原に対する免疫応答がどのように誘導されるかを、抗原特異的な抗体量やエフェクター T 細胞の出現率などを調べることにより、明らかにできる。そこで、本稿では、この獲得免疫機構を利用して、ある抗原に対する免疫応答を実験的に起こし、その反応の程度によって生体における免疫応答がどのように影響をうけたかで評価する方法を紹介する。

準備するもの

1. 実験動物

- ・近交系マウスの BALB/c, C57BL/6, C3H/He などがよく用いられる。
- ・メスの方が扱いやすい。オスはファイティング（けんか）により怪我が多く、またストレスにも弱い。
- ・週齢は重要なので、目的によって選択する。一般的に免疫賦活効果あるいは抑制効果を調べる時は、6～10 週齢を用いることが多い。
- ・実験動物を搬入後、飼育環境に慣れさせてから（馴致）、実験を開始する。

2. 実験器具

- ・フィーディングニードル（テックジャム；FG6204 など）。
- ・ディスポシリンジ(1 mL, 5 mL)
- ・0.5 mL, 1.5 mL マイクロチューブ
- ・マウス保定器具（市販もされているが、ビーカーなどでもよい。）
- ・メス又はカミソリ
- ・微量採血管（ベクトンディッキンソンマイクロティナなど）又はガラスチューブ
- ・96 ウェル ELISA 用マイクロプレート(ヌンクなど)
- ・24, 96 ウェル細胞培養用プレート（ベクトンディッキンソン；Falcon など）
- ・細胞調製用の器具（眼科用ピンセット，ハサミ，パスツールピペット，綿栓付きピペット，ナイロンメッシュ，ディスポチューブなど）
- ・液シン用バイアル（パーキンエルマー社など）

- ・細胞捕集用フィルター (パーキンエルマー社など)

3. 試薬

- ・ PBS (Phosphate buffered saline)

約 800 mL の純水に NaCl (8.0 g) , Na₂HPO₄ · 12H₂O (2.9 g) , KH₂PO₄(0.2 g) , KCl(0.2 g)を加えて溶解させた後, 純水をさらに加え 1 L にする (pH は 7.0) . 経口投与する被験物質や細胞の調製には, オートクレーブまたは 0.2 μm フィルター濾過により滅菌して使用する.

- ・ PBST (ELISA 用)

PBS に 0.05 % になるように Tween 20 を加える.

- ・ 生理食塩水 (経口投与する被験物質の調製)
- ・ ウシ血清アルブミン (ELISA 用のブロッキングバッファーのほか, 抗体の希釈液に用いる) (シグマ社など)
- ・ ウシ胎児血清 (FCS) (細胞培養のほか, 糞便の調製に用いる) (シグマ社など)
- ・ ELISA 用の各種抗体 (酵素標識抗体, ビオチン標識抗体など)
- ・ 基質 (KPL 社 ; TMB 液など) 及び反応停止液 (1 M リン酸など)
- ・ 培地 (RPMI1640 など) (シグマ社など)
- ・ ³H-チミジン溶液 (ICN 社など)
- ・ シンチレーター (パーキンエルマー社など)

4. 機器

- ・ 遠心機
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ マイクロプレートリーダー (バイオラッド社など)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 炭酸ガス培養装置
- ・ 液体シンチレーションカウンター (パーキンエルマー社など)
- ・ セルハーベスター (イノテック社など)

5. 被験物質

- ・ 投与濃度や投与方法を検討した上で, 被験物質を水, 生理食塩水, PBS などに溶解する.

プロトコール

ある抗原に対する免疫応答を測定することにより, その物質の生体 (実験動物) における免疫調節機能を間接的に調べる方法の例を示す.

1. 血液, 糞便を用いた免疫応答 (抗体応答) 評価

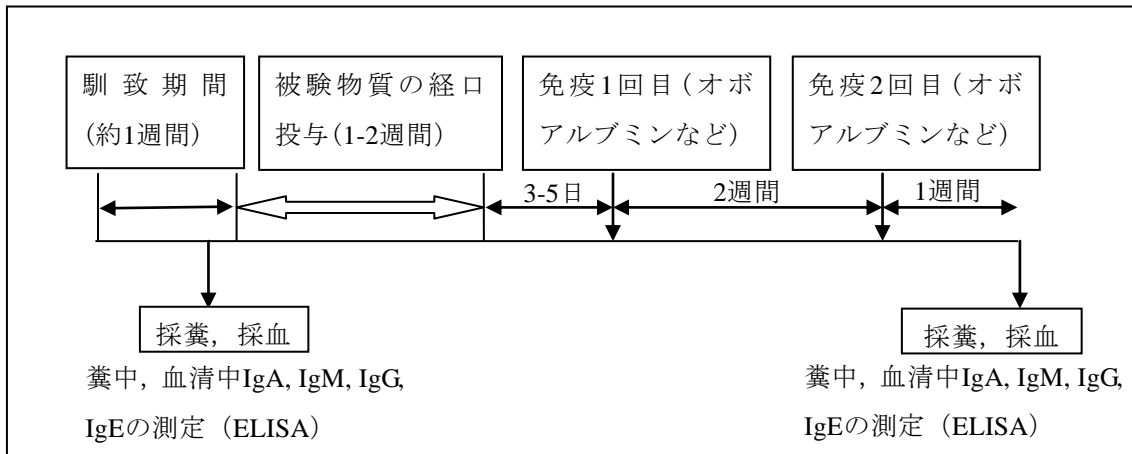


図 1 血液、糞便を用いた免疫応答(抗体応答)評価例

本実験は、経口投与物質の生体への影響を、特定の抗原に対する抗体応答で簡便に解析する方法である。この実験系では、血清中の抗体量は全身の、糞便中の抗体量は消化管局所の免疫応答を反映しており、免疫賦活効果あるいは抑制効果を調べることができる。ここでは、抗原を腹腔免疫し、糞中、血清中の抗体量を測定する場合について説明する。

1) 動物への投与

強制投与の場合は、マウス 1 匹あたり 200 μL の被験液をフィーディングニードルで投与する。また、滅菌した被験物質を専用給水パックで飲水として与える方法や、飼料にまぜて投与することもある。この場合は正確な投与量を知ることは難しいが、強制投与に比較してストレスがなく自然状態での応答が観察できるメリットがある。投与物質のほか、生理食塩水だけなどのネガティブコントロールやポジティブコントロールも加える。

2) 免疫

免疫操作は、被験物質の効果を他の抗原に対する免疫応答で評価するために行う。すなわち、被験物質の最終投与後、3~5 日後にオボアルブミンなどの適当な抗原を

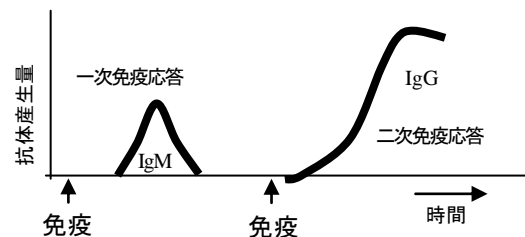


図 2 免疫と抗体応答

アジュバント*とともに腹腔や皮下などに注射する。投与量は、抗原にもよるが一般的にマウス 1 匹あたり 10~100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ 程度である。最初の免疫から 2 週間後に同様に注射(追加免疫)する。1 回目の免疫では、5 量体の IgM が一過性に産生され、2 回目の免疫により二次免疫応答の主役である IgG 抗体が多量に産生される(図 2)。

* アジュバント：免疫応答を増強する物質の総称。分解酵素から抗原分子を保護し、投与局所より持続的に免疫担当細胞を刺激する効果があると考えられている。結核死菌を含むフロイント完全アジュバント (FCA)，含まないフロイント不完全アジュバント (FIA)，水酸化アルミニウムアジュバント (alum)，百日咳菌アジュバントのほか合成ポリマー，糖ペプチドなどが用いられる。アジュバントの種類によって，また投与ルートによって，抗原に対する抗体産生能，細胞性免疫の誘導能に差が見られるほか，抗体のクラス，サブクラスにも影響する。alum と百日咳菌は IgE 抗体を産生させる目的によく利用される。

3) 採血と処理

最終免疫の 1 週間後に採血する。採血は，尾静(動)脈をメスなどで切り，採血するのが簡単である(動物実験の項参照)。微量採血管は少量採血が可能であるが，細めのガラスチューブに採取してもよい。血液が凝固したのち(図 2)，遠心により血清を回収する。細胞を採取するなど目的によってはヘパリンなどの抗凝固剤を加えて採血する。血清は 0.5 mL マイクロチューブなどに小分けして測定まで -80 °C で保存する。

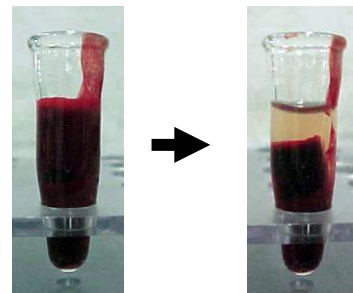


図 3 血清分離

4) 採糞と処理

糞便中には多量の IgA 抗体が含まれているが，プロテアーゼなどにより分解されやすいため，10 %FCS を含む PBS やプロテアーゼインヒビター液(トリプシンインヒビター 0.1 mg/mL，EDTA 50 mM，PMSF 1 mM を含む PBS) を糞の分散液として用いる。

- (1) 新鮮糞 2 粒程度を 1.5 mL マイクロチューブに採取し，重さを測定し，0.1 g/mL になるように分散液を加える。糞の量は多すぎると攪拌しにくいので注意する。
- (2) ボルテックスミキサーなどを用いて攪拌し，懸濁液とする。
- (3) 遠心 (10,000g×5 分) 後，上清を採取し，測定まで -80 °C で保存する。

5) 抗体量の測定

抗体量の測定は ELISA による(酵素免疫測定法の項参照)。

抗体のクラス，サブクラスによって適宜希釈し測定する。マウス血清中では，IgG 抗体がもっとも多く，その多くが IgG1 抗体である(十数 mg/mL)。IgE 抗体量はかなり少ない(数 ng/mL)。IgA 抗体は粘膜で産生される主な抗体で糞便中から多く検出できる(数十 mg/g)。総 IgA，IgG および IgE 抗体量の測定には，抗 Ig 抗体と標識抗 Ig 抗体で各 Ig 抗体を挟んで測定するサンドイッチ ELISA を用いる。キットが市販されており，ng/mL のレベルで検出できる。抗原特異的な抗体量の測

定は、免疫に用いた抗原を 96 ウェルプレートにコーティングし、適宜希釈した抗血清サンプル、標識 2 次抗体、基質を順次加え、吸光値をプレートリーダーで測定する。このとき、標準抗体として過免疫した抗血清をアッセイごとに加えておくといよい。

2. 臓器由来細胞を用いた免疫応答 (T 細胞応答) 評価

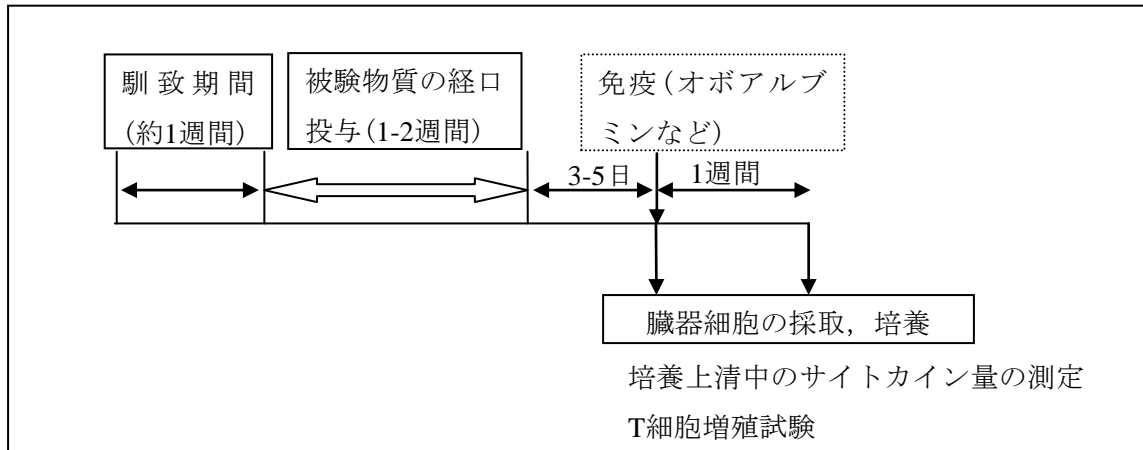


図 4 臓器由来細胞を用いた免疫応答 (T 細胞応答) 評価例

本実験は、特定の抗原に対するマウス T 細胞の反応を簡便に解析する方法である。免疫せずに脾臓や腸管等の腹腔臓器由来細胞を採取、培養し、T 細胞応答を調べる場合と、被験物質の経口投与後、マウスをオボアルブミンなどの抗原で免疫し、臓器由来細胞を再度、同じ抗原 (オボアルブミンなど) で *in vitro* 刺激して T 細胞応答を調べる場合がある。ここでは、抗原を足せき (足の裏) または尾根部に皮下免疫した場合について説明する。

1) 動物への投与 (実験 1 と同)

2) 免疫

経口投与後、オボアルブミンなどの抗原を足せきや尾根部皮下にアジュバントとともに免疫する。抗原の投与量はマウス 1 匹あたり 10~100 μg とする。尾根部には 100 μL 程度注入できるが、足せきは片方 50 μL くらいで漏れやすいので注意する。

3) リンパ節細胞を用いた免疫応答評価

免疫の 1 週間後に腫脹した両足の膝下部やそけい部のリンパ節を採取し、ナイロンメッシュを通して、単細胞浮遊液とする。以下にサイトカイン応答と T 細胞増殖応答の測定についてそれぞれ記す。

(1) サイトカイン応答

- ① リンパ節細胞は 10 % FCS, 50 μM の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI1640

培地に 5×10^6 /mL に分散させ、24 ウェルプレートの各ウェルに 1 mL ずつ播く。

- ② 培地で希釈した抗原 (0.2 μ m のフィルターで滅菌したもの) を細胞の入ったウェルに添加する。37 °C で、5 %炭酸ガスインキュベーターで 24~72 時間培養する。測定したいサイトカインの種類によって培養時間が異なる(たとえば、IL-12 は 24 時間、IFN- γ は 48~72 時間など)。
- ③ 一定時間培養後に培養上清を採取し、サイトカイン量を ELISA により測定する。

(2) T 細胞増殖応答アイトープを用いた場合

- ① 予め、96 ウェルプレート (平底又は丸底) の各ウェルに培地に溶解した抗原溶液を 100 μ l ずつ播き、37 °C、5 %炭酸ガスインキュベーター内に入れておく。
- ② 各臓器由来の細胞は 10%FCS を含む RPMI1640 培地に $2-5 \times 10^6$ /mL に分散させ、①の 96 ウェルプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ播き、3 日間培養する。
- ③ 3 H-チミジンを各ウェルに 18.5 kBq (0.5 μ Ci) 添加し、16~20 時間培養後、細胞をセルハーベスターによりフィルター上に回収し、シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで、 3 H-チミジンの染色体 DNA への取り込み量を測定する。

プロトコールのポイント

<全体>

- ・強制投与を行う場合、投与する時間帯を決めておく。
- ・投与濃度、投与回数、投与方法などは予め検討しておく。

<血液、糞便を用いた免疫応答(抗体応答)評価>

- ・抗体応答の評価試験では、個体差が大きいことが予想されるので、一群の匹数は 10 匹程度準備することが望ましい。
- ・微量採血であれば経時的に採血することも可能だが、血液成分の中には採血前の状態に戻るのに 1 ヶ月近くかかる成分もあるという報告があり、採血回数、採血量ともに最小限にした方がよい。

<臓器由来細胞を用いた免疫応答(T 細胞応答)評価>

- ・試験群が多い場合には、培養時間に影響するのを防ぐため、1 群 3~4 匹とし、細胞を混ぜて試験してもよい。

実験例

マウスに β -ラクトグロブリン水溶液、牛乳を飲水として自由に与え、その間に β -ラクトグロブリンを免疫し、各免疫の 1 週間後に採血して血清中の抗 β -ラクトグロブ

リン抗体量を ELISA により測定した。その結果、水を投与した群は、免疫回数に伴い抗体量の上昇が認められたが、 β -ラクトグロブリン水溶液、牛乳を与えた群ではほとんど上昇しなかった(図 5)。これは、摂取した抗原に対して抗体応答が抑制されている現象(経口免疫寛容現象)を示した例である(文献 4 より改変引用)。

後片付け

シリンジや注射針、血液成分が残る微量採血管等は、研究所等の廃棄物処理方法にしたがって廃棄する。また、実験終了後の動物の処分についても、研究機関等の動物実験等の実施に関する基本指針などに従う。

アイソトープを扱った場合は、「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」や研究機関の放射線予防規定等に従い、放射性廃棄物の分別、保管、廃棄処理を行う。

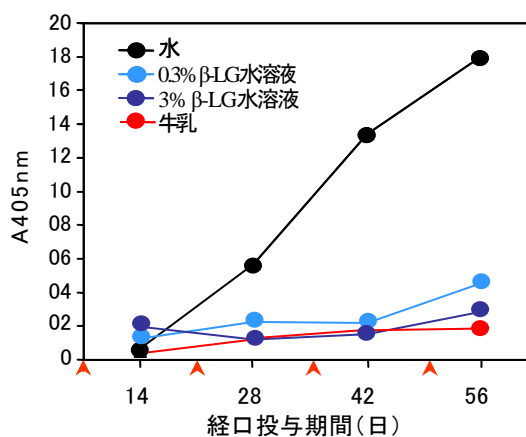


図 5 β -ラクトグロブリンに対する抗体応答の抑制 (▲矢印:免疫)

おわりに

本稿では、動物に被験物質を投与した場合の免疫応答評価方法の一例を述べたが、投与方法、投与量、免疫方法(先に免疫しておくなど)、マウスの系統、月齢、疾患モデル動物などによっても免疫応答は異なるので、実験を計画する段階で十分に検討する必要がある。本評価で得られる結果は、消化管を介して発揮する食品成分の免疫応答調節機能を解明していく上で非常に重要な知見を与えると考えられる。

参考文献

- 1) 水町功子, 栗崎純一, 腸管免疫調節機能, 「食品機能研究法」, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, (光琳, 東京) (2000).
- 2) 中内啓光編 「免疫学的プロトコール」 実験医学別冊, (羊土社, 東京) (2004).
- 3) Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M.J., Immunobiology 6th eds., Garland Science Publishing (2004).
- 4) Mizumachi, K. and Kurisaki, J., Induction of oral tolerance in mice by continuous feeding with β -lactoglobulin and milk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1287-1294 (2002).